

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

“Estudio de las interacciones de FurA y otros reguladores transcripcionales implicados en el metabolismo del hierro y del nitrógeno”

**Proyecto de Fin de Grado en Biotecnología dirigido por
María Luisa Peleato y Laura Botello-Morte**

Nuria Blasco Lavilla

Curso 2013/2014



**Bioquímica y Biología
Molecular y Celular**

M^a LUISA PELEATO, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, y LAURA BOTELLO-MORTE, Personal Docente en el mismo departamento, como directoras del trabajo

AUTORIZAN

a Doña Nuria Blasco a presentar el Trabajo de fin de grado en el contexto de formación del grado “Biotecnología” impartido en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. Dicho trabajo lleva por título: **Estudio de las interacciones de FurA y otros reguladores transcripcionales implicados en el metabolismo del hierro y del nitrógeno**, y ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias.

Para que así conste, firmamos la presente en

Zaragoza a 24 de Junio de 2014.

M^a Luisa Peleato y Laura Botello-Morte

Índice

| | |
|---|----------|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Antecedentes..... | 2 |
| 2.1. Introducción a las proteínas Fur..... | 2 |
| 2.2. Características generales..... | 2 |
| 2.3. Las proteínas Fur en <i>Anabaena</i> sp..... | 4 |
| 2.4. La proteína Fur en <i>E. amylovora</i>..... | 5 |
| 3. Objetivos..... | 6 |
| 4. Materiales y métodos..... | 7 |
| 4.1. Cepas y medios de cultivo utilizados..... | 7 |
| 4.2. Clonaje de <i>furB</i> y <i>furC</i> de <i>Anabaena</i>..... | 7 |
| 4.2.1 Preparación de células quimiocompetentes..... | 7 |
| 4.2.2 Transformación de células quimiocompetentes..... | 7 |
| 4.2.3 Electroforesis de DNA..... | 8 |
| 4.2.4 Purificación de DNA..... | 8 |
| 4.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 8 |
| 4.2.6 Doble digestión y ligación..... | 9 |
| 4.2.7 Experimento doble híbrido..... | 9 |
| 4.3. Purificación y caracterización parcial de Fur de <i>E. amylovora</i>..... | 9 |
| 4.3.1 Electroforesis de proteínas..... | 9 |
| 4.3.2 Sobreexpresión y obtención de biomasa de <i>E. coli</i> | 10 |
| 4.3.3 Empaquetamiento de la columna de afinidad a metales..... | 10 |
| 4.3.4 Obtención del extracto crudo y purificación por IMAC..... | 10 |
| 4.3.5 Diálisis de la proteína y cuantificación..... | 11 |
| 4.3.6 Análisis oligomerización..... | 11 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.7 Detección de zinc estructural en la proteína..... | 11 |
| 4.3.8 Ensayo de actividad de unión al DNA..... | 11 |
| 5. Resultados..... | 12 |
| 5.1. Clonaje de <i>furB</i> y <i>furC</i> de <i>Anabaena</i>..... | 12 |
| 5.1.1 Amplificación de plásmidos e insertos..... | 12 |
| 5.1.2 Doble digestión y ligación..... | 12 |
| 5.2. Cotransformación y experimento doble híbrido..... | 13 |
| 5.3. Sobreexpresión y purificación de Fur de <i>E. amylovora</i>..... | 14 |
| 5.3.1. Sobreexpresión y obtención de biomasa..... | 15 |
| 5.3.2. Purificación de la proteína..... | 15 |
| 5.3.3. Cuantificación de la proteína..... | 17 |
| 5.4. Caracterización parcial de Fur de <i>E. amylovora</i>..... | 17 |
| 5.4.1 Estudio de oligomerización y entrecruzamiento..... | 17 |
| 5.4.2 Detección de zinc estructural..... | 18 |
| 5.4.3 Análisis de la interacción con el DNA..... | 19 |
| 6. Discusión..... | 20 |
| 6.1. Interacciones de FurA, FurB y FurC en <i>Anabaena</i>..... | 20 |
| 6.2. Purificación de Fur de <i>E. amylovora</i>..... | 21 |
| 7. Conclusiones..... | 23 |
| 8. Bibliografía..... | 24 |
| 9. Anexo I..... | 26 |
| 9.1 Cepas y plásmidos utilizados..... | 26 |
| 9.2 Cebadores utilizados para el clonaje de <i>furB</i> y <i>furC</i>..... | 27 |
| 9.3 Cebadores utilizados en secuenciación y detección de inserto..... | 27 |
| 9.4 Cebadores utilizados en la amplificación de promotores para EMSA...27 | 27 |
| 9.5 Composición para dos geles SDS-PAGE al 15%..... | 28 |
| 9.6 Composición para dos geles EMSA al 6%..... | 28 |

ABREVIATURAS

Abs Absorbancia

APS *Ammonium persulfate* (persulfato amónico)

bp *base pairs* (pares de nucleótidos)

BSA *Bovine serum albumin* (albúmina sérica bovina)

DNA Ácido desoxirribonucleico

dNTPs Mezcla de los cuatro desoxinucleótidos rifosfato

D.O. 600 Densidad óptica a 600 nm

DTT 1,4-ditiotreitol

EDTA Ácido etilen-diamino-tetraacético

EMSA *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (ensayo de retardo en gel)

g gramos

h horas

HAc/Ac- Tampón ácido acético/acetato

IMAC *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography* (cromatografía de afinidad metal)

IPTG Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido

kDa kiloDalton

Km Kanamicina

l litro

LB medio de cultivo *Luria-Bertani*

M Concentración molar

Mb Megabases

mg miligramos

min minutos

ml mililitros

mM Concentración milimolar

ng nanogramos

nM Concentración nanomolar

O/N *Overnight* (toda la noche)

PCC Colección de cultivos del *Institut Pasteur*

PCR *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PMSF fluoruro de fenilmetilsulfonilo

p/p relación peso / peso

p/v Relación peso / volumen

Palr0523, Promotor del gen *alr0523*

Pfur, Promotor del gen *fur*

PhrpL, Promotor del gen *hrpL*

PhrpS, Promotor del gen *hrpS*

RNA Ácido ribonucleico

ROS *Reactive Oxygen Species* (especies reactivas de oxígeno)

rpm revoluciones por minuto

SDS *Sodium Dodecyl Sulfate* (dodecil sulfato sódico)

SDS-PAGE *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS)

s segundos

TBE Tris-ácido Bórico-EDTA

TEMED N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamina

Tris Tris-hidroximetil-aminometano

V Voltios

v/v relación volumen / volumen

X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

ε coeficiente de extinción molar

°C grados centígrados

μg microgramos

μl microlitros

μm micrómetros

μM Concentración micromolar

I. Resumen

Las proteínas Fur (ferric uptake regulator) son una superfamilia de reguladores de la transcripción presentes en la mayoría de los organismos procariotas. Tienen un papel clave en la regulación del metabolismo del hierro y en otros procesos celulares clave, como la defensa frente al estrés oxidativo, la regulación del metabolismo del nitrógeno, la diferenciación de heterocistos en cianobacterias o la virulencia en los patógenos [1]. Se han abordado dos objetivos principales referidos a las proteínas Fur. Por un lado se han estudiado las interacciones entre las proteínas de la familia Fur presentes en *Anabaena* sp. PCC 7120: FurA, FurB y FurC *in vivo*. Los resultados obtenidos indican que las proteínas FurA, FurC y en menor medida, FurB, forman homodímeros, y que es muy posible que las tres proteínas interactúen entre sí. Por otro lado se ha purificado la proteína Fur de *Erwinia amylovora* y se ha realizado una caracterización parcial. *E. amylovora* es la bacteria que causa el fuego bacteriano, una enfermedad de las plantas muy extendida y que ha causado graves problemas fitosanitarios y económicos [2]. La captación de hierro en el hospedador es uno de los principales mecanismos de patogenicidad de esta enfermedad por lo que el estudio de Fur permitirá conocer mejor el mecanismo de infección de *E. amylovora* y aplicar posibles soluciones para remediar el fuego bacteriano. Se ha purificado Fur de *E. amylovora* por columna de afinidad a Cu^{2+} , se ha hecho un estudio de oligomerización y se ha detectado zinc estructural en su forma reducida.

Abstract

The members of the Fur (ferric uptake regulator) superfamily are transcriptional regulators present in the majority of prokaryotic organisms. They have a key role in the regulation of iron metabolism, but are also implicated in other key cellular processes, such as defense against oxidative stress, regulation of nitrogen metabolism, the differentiation of heterocysts in cyanobacteria or virulence in the case of pathogenic bacteria [1]. The goal of this work is twofold: Firstly the interactions amongst the Fur protein family members present in *Anabaena* sp. PCC 7120: FurA, FurB and FurC were studied *in vivo*. The results obtained indicate that FurA, FurC and to a lesser extent FurB tend to form homodimers, and the results suggest that heterodimers can be also possible. Secondly the Fur protein of *Erwinia amylovora* was purified and a partial characterization was undertaken. *E. amylovora* is the causative agent of fire blight, a widespread plant disease that has already caused significant sanitary and economic problems [2]. Since iron uptake in the plant host is one of the main mechanisms of pathogenicity in this disease, it is expected that Fur studies can lead to a better understanding of the process of infection used by *E. amylovora*, and may ultimately offer possible remedies for fire blight. The protein was successfully purified with a Cu^{2+} affinity column, its capability to oligomerize was noted and structural zinc was detected in its reduced form.

2. Antecedentes

2.1 Introducción a las proteínas Fur

Con una sola excepción descrita (*Borrelia*) [3], los organismos procariotas necesitan el hierro como micronutriente esencial. El hierro se encuentra poco disponible en muchos ecosistemas y ha llevado a los microorganismos a desarrollar una serie de estrategias para disminuir sus requerimientos y aumentar su captación del medio. Por otro lado, el exceso de este metal en el organismo puede ser altamente tóxico para las células al desencadenar un aumento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno. La homeostasis del hierro es por tanto muy importante y las proteínas Fur (ferric uptake regulator) son las responsables de este proceso. Además, las proteínas Fur engloban una superfamilia de metalorreguladores implicados en el estrés oxidativo y el metabolismo de otros metales: Zur (zinc uptake regulator), Mur (manganese uptake regulator), Nur (nickel uptake regulator), PerR (peroxide stress response regulator) y el regulador de la respuesta a hierro hemo-dependiente, Irr [1].

2.2 Características generales

El mecanismo clásico aceptado para el modelo de la función de las proteínas Fur consiste en la formación de dímeros para unirse a los promotores de sus genes diana y reprimir su transcripción utilizando un metal como represor. La coordinación con el metal causa en ellas un cambio conformacional que promueve su unión al DNA en secuencias ricas en A/T [4].

Estructuralmente, las proteínas de la superfamilia Fur comparten un pliegue de unos 120 aminoácidos y se componen de un dominio de unión a DNA del tipo WH (*winged helix*), situado en el extremo N-terminal, y de una secuencia de unión a metales situada en el extremo C-terminal. Este último dominio también es responsable de la dimerización. Además, contienen el motivo HHHXHX₂CX₂C al comienzo del dominio C-terminal [1]. Se ha visto que pueden tener hasta dos sitios de unión a metal adicionales al correpresor. Su función no está clara todavía. En muchos casos el metal correpresor se une con gran afinidad a la zona bisagra que separa los dos dominios de la proteína. Concretamente, en las proteínas Fur, el metal correpresor, hierro, está penta-coordinado por tres residuos de histidina y dos ácidos. También en algunos miembros esta familia se ha encontrado zinc, que en algunos casos funciona como metal estructural que estabiliza la forma dimérica [5]. Su sitio de unión puede encontrarse tanto en el núcleo del dominio C-terminal, como cerca del mismo. En el segundo caso suele encontrarse coordinado por cuatro cisteínas en dos motivos CXXC. Finalmente, hay que decir que la estructura descrita es muy general y existe una gran variedad entre las proteínas Fur. Un ejemplo de ello es Fur de *Helicobacter pylori*, cuyos dominios N y C-terminal no responden a los descritos [6].

La secuencia de unión de Fur al DNA o caja Fur se ha definido de distintas formas, sin embargo la más aceptada parece consistir en dos hexámeros GATAAT en dirección 5'→3', separados por un par de bases de un tercer hexámero en la orientación inversa [7]. En algunos

casos se encuentran también otros motivos estructurales adicionales en la zona de unión al DNA que optimizan la interacción [8].

Las proteínas Fur parecen ser las más extendidas dentro de la superfamilia Fur aunque sus funciones todavía no se conocen completamente. La gran cantidad de genes que son regulados por Fur indican que su función reguladora debe ser muy importante, sin embargo la función de muchos de sus genes diana se desconoce. Además de su función como regulador génico, se cree podría tener otras funciones, ya que es capaz de interactuar con moléculas señalizadoras como el grupo hemo, el NO y el CO [9, 10], con otras proteínas que responden al estrés oxidativo y ha mostrado actividad disulfuro reductasa en cianobacterias, por lo que podría participar en respuestas detoxificantes e incluso tener un papel intrínseco en ellas [11].

Fur controla la homeostasis del hierro en la mayoría de los procariotas, con la excepción de las bacterias Gram-positivas con alto contenido en GC y las arqueobacterias [1]. Participa como regulador en la transcripción de genes necesarios para la captación del hierro como los que intervienen en la síntesis de sideróforos y sus receptores, transportadores ABC y proteínas para su almacenamiento [12]. Tiene un papel destacado en algunos mecanismos de patogénesis al controlar la expresión de factores de virulencia y la producción de algunas toxinas en bacterias de vida libre. Pero no solo regula la defensa a la limitación de hierro que sufrirían los patógenos en diversos hábitats, también juega un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo y nitrosativo que pueda causarle el hospedador. Por otro lado se ha visto que participa en procesos no relacionados con el hierro como la tolerancia a ácido, la captación de riboflavina, la formación de biofilms, la respuesta a estrés osmótico, la regulación del quorum sensing, la resistencia a cianuro, el control de la respiración y la diferenciación de los heterocistos en las cianobacterias [1].

En cuanto a su mecanismo de acción, hasta ahora se creía que Fur funcionaba como un represor transcripcional mediante la unión del dímero Fur-Fe²⁺ a elementos *upstream* de sus genes diana [4]. Sin embargo, cada vez se están encontrando más casos en los que Fur reprime a sus genes diana en la forma de apoproteína o los activa en la forma Fur-Fe²⁺ [13]. La activación de genes se ha visto que puede llevarla a cabo de forma directa, posicionando a la RNA polimerasa, y en un menor número de casos de forma indirecta mediante el desplazamiento de una proteína H-NS que permite la unión de la RNA polimerasa o a través de la represión de genes que codifican sRNAs [14].

Las proteínas Fur suelen estar auto-reguladas mediante la unión de las mismas a sus propios promotores. También intervienen otros efectores que varían en función del metabolismo de la bacteria, como otros reguladores transcripcionales que incluyen otras proteínas Fur especializadas [1, 15]. Su regulación es muy compleja, y en ella no solo intervienen reguladores transcripcionales que responden al nivel de hierro, sino que también participan otros que responden a ROS, a Mn²⁺ y a las reservas intracelulares de carbono y nitrógeno [1, 16]. Cuentan con regulación postranscripcional que viene dada por RNAs antisentido [17] y también están reguladas por modificaciones postraduccionales que impiden su unión al DNA, como su interacción con hemo y con NO, o el cambio en el estado redox de sus cisteínas [1].

2.3 Las proteínas FurA, FurB y FurC en *Anabaena* sp.

Las cianobacterias son un grupo de eubacterias Gram-negativas. Son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. Constituyen un grupo muy heterogéneo capaz de colonizar océanos, suelos y aguas continentales, e incluso ambientes extremos. Pueden presentar tamaños muy diferentes y ser unicelulares o filamentosas.

En cuanto a su fisiología, poseen tilacoides con el aparato molecular necesario para realizar la fotosíntesis, carboxisomas con la enzima rubisco para fijar el CO₂ en forma de azúcares mediante el ciclo de Calvin, y pueden dar lugar a células especializadas capaces de fijar el N₂ atmosférico a NH₄⁺, los heterocistos. Además, algunas son capaces de producir las cianotoxinas, las cuales pueden ser neurotóxicas, hepatotóxicas o dermatotóxicas.

El género *Anabaena* está formado por cianobacterias filamentosas, comunes en aguas saladas. Dentro de estas, la cepa *Anabaena* sp. PCC 7120 es conocida por su gran capacidad de fijar el N₂ atmosférico en los heterocistos, lo que ha llevado a utilizarla como biofertilizante [18].

Anabaena posee unos requerimientos de hierro altos, ya que tanto sus complejos fotosintéticos como los de fijación del N₂ utilizan hierro. Para mantener la homeostasis del hierro, *Anabaena* cuenta con tres homólogos de Fur: FurA, FurB y FurC.

FurA es la más abundante y la que mayor homología presenta con las proteínas Fur de otros microorganismos y por tanto interviene en todas las funciones citadas anteriormente, siendo esencial para la viabilidad celular. Tiene un peso molecular de 17,5 kDa. No se ha detectado en ella metal estructural. Puede unirse a su propio promotor *fur*, lo que le permite autoregularse. Se ha identificado un RNA antisentido α -*furA* que también regula su expresión. La oxidación de sus cisteínas así como la unión a hemo inhiben su unión al DNA mientras que la presencia de hierro la favorece. En cianobacterias, se caracteriza además por su papel en la diferenciación de heterocistos y su actividad disulfuro reductasa [19, 20].

FurB tiene un peso molecular de 15,2 kDa. Se ha identificado como una proteína Zur. Se une a los promotores de *furA*, *furB* y *furC*, pero lo hace más fuertemente en ausencia de Zn²⁺. Distintos ensayos han llevado a proponer una función dual de FurB, en ausencia de estrés oxidativo, se expresaría poco y actuaría como regulador génico mediante la unión a las cajas *fur*, y bajo estrés oxidativo su expresión incrementaría y actuaría uniéndose inespecíficamente al DNA protegiéndolo del daño oxidativo. Además, se ha visto que no es esencial pero su ausencia provoca alteraciones en la morfología celular y en la membrana plasmática [21].

Por último, FurC tiene un peso molecular de 17,4 kDa. Aunque se conoce poco de ella, se sabe que se induce bajo estrés oxidativo y estudios de este departamento llevan a pensar que podría participar en la estabilización de los ficobilisomas, complejos proteicos asociados al fotosistema II de las cianobacterias. En déficit de ficobiliproteínas, se induciría la transcripción de FurC que se uniría a los ficobilisomas evitando su degradación y aumentando sus pigmentos fotosintéticos [22]. Recientemente ha sido identificada como proteína PerR [23]. Además ensayos *in vitro* sugieren que FurC no se une a los promotores *fur* pero es capaz de potenciar la unión de FurA a sus dianas, y de inhibir la de FurB [24].

2.4 La proteína Fur en *Erwinia amylovora*

El género *Erwinia* agrupa a un conjunto de enterobacterias asociadas a plantas, Gram negativas, bacilares, no formadoras de esporas y móviles. Dentro de este género se distinguen varios grupos en función de su patogenicidad. *E. amylovora* es la especie tipo del grupo I que incluye a las especies que causan necrosis o marchitamientos en plantas, o que crecen en el exterior de la planta (epifitas). Presenta una amplia variabilidad fenotípica, pero todas las cepas se caracterizan por ser anaeróbicas facultativas, presentar entre 2 y 7 flagelos peritricos y una envoltura de exopolisacáridos implicada en su patogenicidad, el fuego bacteriano [2].

El fuego bacteriano fue la primera enfermedad infecciosa en plantas en la que se demostró que el agente causal era una bacteria. Se describió por primera vez en el siglo XVIII en Estados Unidos y a partir de entonces se ha extendido al resto de continentes. Es una enfermedad que afecta principalmente a la familia de las rosáceas, tanto frutales como ornamentales y silvestres, lo que ha causado grandes problemas fitosanitarios y económicos. Actualmente todos sus brotes se encuentran erradicados o en proceso de erradicación [2].

Aunque no se sabe con exactitud el mecanismo por el cual *E. amylovora* causa el fuego bacteriano, se han identificado cuatro factores que intervienen en la patogénesis: los genes *hrp* que codifican para un grupo de proteínas que la bacteria secreta e inyecta en las células vegetales causando una reacción de hipersensibilidad, los genes *dsp* requeridos para el desarrollo de los síntomas aunque no para la hipersensibilidad, la cápsula de polisacáridos que protege a la bacteria de las reacciones defensivas de la planta, y los sideróforos o desferrioxiaminas, que permiten a la bacteria superar las condiciones de baja disponibilidad de hierro en los tejidos del huésped y actúan como agentes protectores frente a compuestos tóxicos producidos por la planta [2]. En este último mecanismo es donde entra en juego Fur.

Aunque no se han realizado estudios sobre las funciones y características de Fur en *E. amylovora*, se ha identificado tanto el gen que codifica la proteína como 29 cajas *fur* en el genoma de la bacteria [25]. Tiene un peso molecular teórico de 16,8 kDa según la base de datos Uniprot. En estudios llevados a cabo para comprender los mecanismos de patogenicidad de *E. amylovora* se ha visto que actúa como regulador transcripcional de genes que codifican para sideróforos. Concretamente, se ha visto que en condiciones de baja disponibilidad de hierro, se inducen los genes *dfo* y *foxR* que codifican distintos sideróforos para la captación de hierro, y al receptor de los sideróforos cargados, respectivamente. Esta regulación se cree que es llevada a cabo por Fur, ya que tanto el gen *foxR* como el gen *dfoJ* poseen una caja *fur* *upstream*. En cuanto a los otros genes que codifican para sideróforos, *dfoA* y *dfoC* se cree que podrían estar regulados también por la caja Fur de *dfoJ*, ya que se sitúan *downstream*, muy cercanos a éste y por tanto podrían dar lugar a un mismo transcrito (*dfoJAC*) [26].

Por otra parte, cabe destacar que Fur podría regular otros genes implicados en la patogénesis y no asociados directamente al hierro, ya que se ha visto que en *E. chrysanthemi* no solo regula la transcripción de genes que codifican sideróforos, sino que también interviene en la regulación de genes que codifican pectinolasas, enzimas que intervienen en la rotura de la pared vegetal y por tanto en la patogenicidad de la bacteria [27].

3. Objetivos

En este trabajo se diferencian dos objetivos principales. Por un lado se trató de confirmar la posible interacción de las proteínas FurA, FurB y FurC de *Anabaena* sp. PCC 7120 para confirmar la hipótesis de formación de heterodímeros de carácter regulador [24]. Por otro lado se purificó y se realizó una caracterización parcial de la proteína Fur de *E. amylovora* por su posible implicación en el mecanismo de patogenicidad que causa el fuego bacteriano [2]. En este contexto se han marcado los siguientes objetivos específicos:

1. Clonaje de FurB y FurC de *Anabaena* sp. PCC 7120 en los plásmidos del kit “*Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit*” (Euromedex).
2. Análisis de la homodimerización y heterodimerización de las proteínas FurA, FurB y FurC *in vivo* mediante el ensayo doble híbrido en *E. coli* BTH101.
3. Sobreexpresión de Fur de *E. amylovora* como proteína recombinante en *E. coli* y purificación.
4. Análisis de la capacidad de oligomerización de Fur de *E. amylovora* en condiciones reductoras y de entrecruzamiento mediante electroforesis.
5. Detección de zinc estructural mediante electroforesis con tinción PAR en Fur de *E. amylovora*.
6. Estudio de la capacidad de unión de Fur de *E. amylovora* a los promotores de los genes *fur*, *hrpL* y *hrpS*, en condiciones reductoras y oxidantes, y en presencia y ausencia de magnesio y zinc.

4. Materiales y Métodos

4.1 Cepas y medios de cultivo utilizados

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo, así como su uso y la casa comercial de la que proceden, se recogen en el **anexo I, tabla 9.1**.

El cultivo de *E. coli* se realizó en medio de cultivo LB esterilizado con una composición de 10 g/l de NaCl, 10 g/l de triptona y 5 g/l de extracto de levadura, suplementado con el correspondiente antibiótico de selección, 50 µg/ml de kanamicina y/o 100 µg/ml ampicilina (Sigma) cuando fuera necesario. Para la siembra en medio sólido se complementó este medio líquido con 1,5% de agar. Para realizar el experimento doble híbrido se adicionó a las placas X-Gal e IPTG a concentración de 40 µg/ml y 1 mM, respectivamente. Los cultivos en placa se crecieron O/N en estufa a 37°C salvo los cultivos del experimento doble híbrido, que se crecieron a 30°C. Los cultivos en medio líquido se crecieron a 37°C y en agitación a 200 rpm.

4.2 Clonaje de FurB y FurC de *Anabaena*

4.2.1 Preparación de células quimiocompetentes

Para preparar las células quimiocompetentes se partió de un cultivo de 10 ml de LB en fase estacionaria de células no competentes. Se refrescó el cultivo a una concentración 1:50 y se dejó incubar a 37°C en agitación hasta que alcanzó la fase de crecimiento exponencial. A partir de este punto las células se mantuvieron en frío en todo momento. Se incubaron en hielo durante 20 min. Se centrifugaron a 4000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Se desecharon los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets suavemente en 10 ml de Buffer 1 por duplicado (14,7 g/l CaCl₂, 14,2 g/l MgCl₂ y 3,2g/l NaCl). Se centrifugaron nuevamente a 4000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Se desecharon los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets en 2 ml de Buffer 2 frío (14,7 g/l CaCl₂, 15% (v/v) glicerol). Las suspensiones se repartieron en alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf y se conservaron a -80°C.

4.2.2 Transformación de células quimiocompetentes

La transformación de células quimiocompetentes se realizó descongelando la cantidad de células quimiocompetentes necesaria en baño de hielo. Se adicionaron aproximadamente 100 ng del DNA a transformar por cada alícuota de 200 µl de células quimiocompetentes, dejando una alícuota como control negativo. Se mezcló suavemente y se incubaron en baño de hielo durante 5 minutos. Se aplicó un choque térmico a 42°C durante 30 segundos y seguidamente se metieron las células en baño de hielo durante 2 minutos. A continuación se añadieron 800 µl de medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C, 200 rpm durante 45-60 minutos. Finalmente se sembraron 200 µl de cada cultivo en césped, en placas con LB agar con el antibiótico de selección y se incubaron las placas O/N.

4.2.3 Electroforesis de DNA

Las electroforesis de DNA se realizaron en geles de agarosa al 0,8% para correr los plásmidos y al 1,5% para los insertos, en 50 ml de TBE 1X (90 mM Tris/HCl pH 8, 90 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA) con bromuro de etidio a 0,5 µg/ml como agente intercalante. El tampón de carga utilizado fue 6x Loading Dye Solution (Fermentas), y los marcadores de talla, Lambda DNA/*Hind*III Marker (Fermentas) para los plásmidos y ΦX174/*Hae*III (Fermentas) para los insertos. Se corrieron las electroforesis a una intensidad de voltaje de 120 V durante 20 minutos y se visualizaron los resultados con un equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

4.2.4 Purificación de DNA

Se han realizado tres purificaciones distintas de DNA. La primera, la purificación de plásmidos a partir de cultivos en fase estacionaria, se realizó siguiendo el protocolo del kit de purificación de plásmidos “*GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*” (Sigma). La purificación de los productos de PCR y de los insertos digeridos se realizó con el kit de purificación “*DNA GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la purificación de los vectores se hizo mediante precipitación de DNA: a cada muestra se le añadieron 450 µl de EtOH y AcNa 3 M pH 5,2 y se dejaron incubar las mezclas a -20°C O/N. Se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm y 4°C durante 30 min. Se desecharon los sobrenadantes y se lavaron los pellets con 500 µl de EtOH frío al 70%. Se centrifugaron las mezclas a 14000 rpm y 4°C durante 5 min. Se desechó el sobrenadante, se dejaron secar los pellets al aire durante 10 min y se resuspendieron en 50 µl de agua miliQ. La concentración de DNA extraída se determinó en todos los casos mediante espectroscopía de absorción molecular con el equipo NanoVue PlusTM (GE Healthcare).

4.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó con diversos propósitos: en la amplificación de los insertos *furB* y *furC*, en la amplificación del DNA de colonias transformadas con la mezcla de ligación para comprobar si tenían el plásmido recombinante y en la amplificación de los promotores utilizados en el ensayo de retardo en gel (EMSA). Se utilizó la enzima *Pfu* Ultra (Stratagene). Cuando se requería una amplificación de alta fidelidad, y la enzima *Taq* (Biotools) para el resto de los casos. Para realizar la PCR de colonias, la muestra se tomó rascando la colonia con un palillo y sembrando además la colonia en una placa réplica.

La secuencia de cada oligonucleótido utilizado, así como el sitio de restricción introducido en los insertos para el clonaje de *furB* y *furC* se detallan en el **anexo I, tablas 9.2, 9.3, 9.4.**

El programa a utilizar consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 30-32 ciclos de amplificación con la desnaturalización de 30 s a 95°C, la hibridación de 45 s a 50-55°C, y la extensión de 2 min/Kb a 72°C, una extensión final de 7 min a 72°C y un mantenimiento a 4°C.

4.2.6 Doble digestión y ligación

La digestión de los plásmidos y de los insertos se realizó con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I (Fermentas). Las mezclas de digestión se prepararon añadiendo el doble de la enzima *Kpn*I que de la enzima *Bam*HI, en buffer de *Bam*HI. Se incubaron las mezclas de digestión a 37°C durante 1h 45 min.

Una vez digeridos y purificados los plásmidos y los insertos, se realizó la ligación de cada vector ambos insertos, *furB* y *furC*, con T4 DNA ligasa (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Se incubaron las mezclas de ligación a temperatura ambiente durante unas 3h y a 4°C durante toda la noche antes de ser transformadas en *E. coli* XL1-Blue.

4.2.7 Experimento doble híbrido

Para realizar el experimento doble híbrido se utilizó el kit “*Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit*” (Euromedex) cuyo fundamento principal consiste en clonar los genes de las proteínas cuya interacción se quiere observar como proteínas de fusión a dos fragmentos complementarios de la proteína adenilato ciclasa (*Bordetella pertussis*). Así, cuando se cotransforman células con los plásmidos que contienen los dos fragmentos de adenilato ciclasa por separado, si las proteínas de interés interaccionan, se regenera la actividad de adenilato ciclasa que da lugar a la producción de cAMP activando el operón *lac* y haciendo que las células sean capaces de degradar el sustrato X-Gal que da un producto de color azulado [28]. Para ello se cultivaron las células en placas con X-Gal a 40 µg/ml e IPTG a 1 mM para inducir la sobreexpresión de las proteínas. Así, pudo comprobarse las interacciones entre FurA, FurB y FurC de *Anabaena* sp. PCC 7120 y su formación de homodímeros *in vivo*.

4.3 Purificación y caracterización parcial de Fur de *E. amylovora*

4.3.1 Electroforesis de proteínas

Las electroforesis de proteínas para el análisis de Fur de *E. amylovora* se realizaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes SDS-PAGE al 15% cuya composición se indica en el **anexo I, tabla 9.5**.

Las muestras se prepararon mezclando 15 µl de muestra proteica con 3 µl de tampón de carga 6x (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 2.5% SDS, 5% de β-mercaptoetanol, 10% de glicerol y 0.02% de azul de bromofenol). Después se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron a 14.000 durante otros 5 min. El marcador de peso molecular utilizado fue la mezcla de proteínas “*LMW Protein Mixture*” (Amersham Biosciences). El tampón de electroforesis usado estaba compuesto por 25 mM Tris/pH 8,8, 200 mM de glicina y 3,5 mM de SDS. Se corrieron las electroforesis a 35 mA por gel hasta que el frente alcanzaba el final del gel. Para la visualización de los resultados, los geles se tiñeron con una disolución colorante con 0.05% (p/v) de Coomassie Blue R-250, 6% de ácido acético, 45% de metanol y 49% de agua. Después de teñir los geles durante 20 min en agitación a 100 rpm, se destiñeron con una solución de 10% de ácido acético, 25% de metanol y 65% de agua. Los resultados se visualizaron con un Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

4.3.2 Sobreexpresión y obtención de biomasa de *E. coli*

Se partió de células de *E. coli* con el plásmido pET28a que tenía clonado el gen *fur* de *E. amylovora*. Se testaron 4 colonias para comprobar su sobreexpresión. Para ello se pusieron cultivos O/N, se refrescaron a una concentración 1:100 y se incubaron a 37°C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. A continuación se dividió el cultivo en dos alícuotas de las cuales una se dejó como control, sin inducir, y en la otra se indujo la sobreexpresión añadiendo IPTG a una concentración de 1 mM para inducir la expresión de Fur. Se incubaron todos los cultivos durante 3h y después se extrajo una alícuota de cada uno para hacer un *screening* de expresión mediante una electroforesis SDS-PAGE. Aquella colonia que mayor sobreexpresión mostró se cultivó a gran escala en las mismas condiciones para la obtención de 5 l de cultivo de *E. coli* sobreexpresando Fur. El cultivo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Los pellets se lavaron con 0,15 M NaCl y la biomasa obtenida y se conservó a -20°C.

4.3.3 Empaquetamiento de la columna de afinidad a metales

Para la purificación de la proteína se utilizó una cromatografía de afinidad a metales con Cu^{2+} como metal inmovilizado en la matriz. Todos los tampones se desgasificaron y filtraron antes de ser utilizados. La columna se empaquetó con 7 ml de “*Chelating Sepharose Fast Flow*” (GE Healthcare). A continuación se lavó la matriz con 10 volúmenes de agua miliQ, se pasaron 3 volúmenes de una disolución de CuSO_4 0,25 M y se eliminaron los restos de metal con 5 volúmenes de agua miliQ. El equilibrado se realizó con 5 volúmenes del tampón de unión (50 mM Tris/HCl, pH 8, 300 mM NaCl).

4.3.4 Obtención del extracto crudo y purificación por IMAC

Se descongelaron 5 g de biomasa en 25 ml de tampón de unión con 2 mM PMSF como inhibidor de proteasas. Se sonicaron las células en baño de hielo con 10 ciclos de 45 s separados por 30 s de pausa, con una amplitud del 80% y un ciclo de 0,5. Se clarificó el extracto crudo mediante tres centrifugaciones de 20000 rpm y 4°C durante 20 min cada una. El extracto resultante se filtró mediante dos filtros de 0,8 y 0,22 μm .

Se pasó el extracto crudo por la columna de IMAC. Se lavó con 10 volúmenes de tampón de unión con 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para romper las interacciones inespecíficas y seguidamente con tampón de unión con 35 mM de glicina hasta que la observancia fue de $\text{Abs}_{280\text{nm}} = 0,15$. Finalmente se eluyeron las proteína con un gradiente de 0-1M de imidazol en tampón de unión. Se recogió el eluido en alícuotas de 1 ml y se guardaron las alícuotas a 4°C.

Finalmente se analizó la presencia de la proteína Fur mediante electroforesis SDS-PAGE y se regeneró la matriz pasando 10 volúmenes de agua miliQ para eliminar el imidazol, 0,5 volúmenes de Strip Buffer (0,2 M EDTA, 0,5 M NaCl) para quitar el metal, 5 volúmenes de NaCl 0,5 M para eliminar las proteínas inespecíficamente unidas a la matriz, 5 volúmenes de agua miliQ para lavar la matriz, y 5 volúmenes de EtOH al 20% como medio para preservarla. La matriz se conservó en EtOH al 20% y a 4°C.

4.3.5 Diálisis de la proteína y cuantificación

Se dializó la proteína en tampón de diálisis (50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM de NaCl y 10% de glicerol) a 4°C. Se realizaron tres cambios de tampón cada 3h. Terminada la diálisis, se centrifugaron las muestras a 4000 rpm, 4°C y 15 minutos para eliminar posibles precipitados.

La proteína se cuantificó por espectrofotometría de absorbancia molecular mediante la ley de Beer-Lambert ($Abs = -\log(I/I_0) = \epsilon \cdot c \cdot l$), usando como blanco el tampón usado en la última diálisis, y tomando el coeficiente de extinción teórico del servidor ProtParam de ExPASy para la proteína oxidada ($\epsilon_{280} = 6210 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Finalmente se alicuotó y se guardó a -20°C.

4.3.6 Análisis de oligomerización

Para comprobar la oligomerización de la proteína se hizo un ensayo de reducción y otro de entrecruzamiento cuyos resultados se analizaron con una electroforesis SDS-PAGE al 15%. En el ensayo de reducción se incubaron las muestras de proteína a 10 mM de DTT durante 10 min, dejando muestras como control negativo y utilizando tampón de carga sin β -mercaptoetanol. En el ensayo de entrecruzamiento se incubó una muestra a 0,5% de glutaraldehído durante 15 min y en oscuridad y se dejó otra muestra como control negativo.

4.3.7 Detección de zinc estructural en la proteína

Sobre gel SDS-PAGE al 15% corrido con muestras de la proteína, se aplicó una solución de 50 ml de 20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 500 μM PAR y 5% glicerol, y añadiendo H_2O_2 50 mM hasta que se observó la aparición de alguna banda naranja que indicaba la presencia de zinc. Una vez fotografiado el resultado se retiró la solución de PAR y se procedió a la tinción usual con azul de Coomassie.

4.3.8 Ensayo de actividad de unión al DNA

Los ensayos de actividad de unión al DNA (EMSA) se realizaron en condiciones nativas con geles PAGE al 6% cuya composición se detalla en el **anexo I, tabla 9.6**. El tampón de electroforesis usado tenía una composición de 6,06 g/l Tris, 28,4 g/l glicina pH 8, y el tampón de carga utilizado fue 50 mM Tris/HCl pH 8, 30% de glicerol, 0.25% (p/v) de azul bromofenol y 0.25% (p/v) de xilenocianol FF. Los geles se precorrieron a 60 V y 4°C durante 45-60 min para equilibrar el sistema.

Cada muestra se preparó en un volumen final de 20 μl , con 40 ng de DNA inespecífico *Palr0523*, 40 ng del DNA específico y 0,01 mg/ml de BSA en tampón de unión (10 mM Bis Tris pH 7,5, 40 mM KCl, 1 mM MgCl y 5% glicerol). Se utilizaron concentraciones de proteína entre 300 y 1000 nM en presencia o ausencia de DTT, EDTA, Mn^{2+} y Zn^{2+} 1 mM según la muestra. Las mezclas de reacción se incubaron durante unos 15 min a temperatura ambiente antes de añadirles 3 μl del tampón de carga y cargarlas en el gel. Los geles se corrieron a 90-100 V y 4°C hasta que el frente alcanzó el final del gel. Para visualizar los resultados, se incubaron los geles con 50 ml de tampón de electroforesis a los que se les añadió 5 μl de Vistra Green™ 10000X (Amersham Biosciences), durante 20 minutos, en agitación suave y oscuridad. Los resultados se visualizaron con un Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

5. Resultados

5.1 Clonaje de FurB y FurC de *Anabaena*

Se clonaron los genes *furB* y *furC* como proteínas de fusión a los fragmentos T25 y T18 de la proteína adenilato ciclasa. Los vectores recombinantes se cotransformaron en células de *E. coli* BTH101 y se cultivaron las células en presencia de X-Gal e IPTG. El IPTG produjo la sobreexpresión de las proteínas que, al interaccionar, reestablecieron la proteína adenilato ciclasa dando lugar a la activación del operón *lac* y a la degradación de X-Gal para dar un compuesto azul. Esto permitió ver las interacciones entre FurA, FurB, y FurC.

5.1.1 Amplificación de plásmidos e insertos

Se clonaron los genes de *furB* y *furC* en los plásmidos del kit doble híbrido (**anexo I, tabla 9.2**) utilizando los sitios de restricción de las enzimas *KpnI* y *BamHI* (Fermentas). Una vez recibidos los cebadores, se amplificaron los insertos a partir de DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 por PCR y se purificaron los productos. Paralelamente los plásmidos del kit se replicaron creciendo cultivos con las cepas que los contenían y se purificaron (**figura 5.1**).

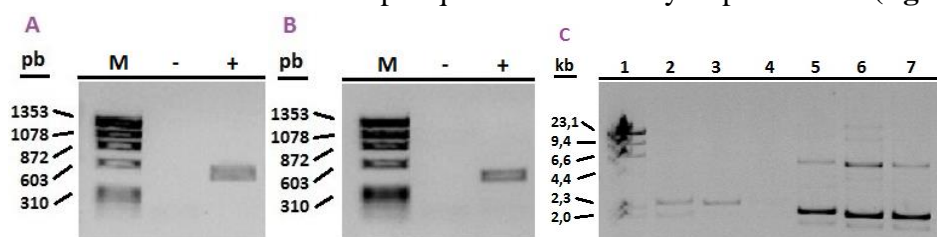


Figura 5.1. Amplificación y purificación de los insertos y los plásmidos del kit de doble híbrido. Amplificación y purificación de los genes *furC* (A) y *furB* (B): carril M: marcador de peso molecular, carril -: control negativo de la PCR, carril +: control positivo (PCR sobre DNA genómico). Purificación de los plásmidos (C): carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: pKT25-zip, carril 3: pKNT25, carril 4: PKT25, carril 5: pUT18C-zip, carril 6: pUT18C y carril 7: pUT18.

5.1.2 Doble digestión y ligación

Obtenidos los plásmidos y los insertos amplificados, se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI* para conseguir un clonaje direccional (**figura 5.2**).

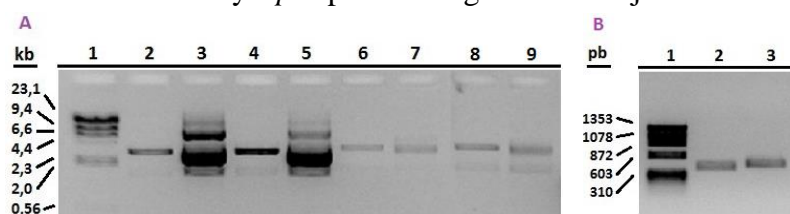


Figura 5.2. Digestión de los insertos y los plásmidos del doble híbrido. Plásmidos (A): carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: pUT18C digerido, carril 3: pUT18C sin digerir, carril 4: pUT18 digerido, carril 5: pUT18 sin digerir, carril 6: pKNT25 digerido, carril 7: pKNT25 sin digerir, carril 8: pKT25 digerido, carril 9: pKT25 sin digerir. Insertos (B): carril 1: marcador, carril 2: *furB* digerido, carril 3: *furC* digerido.

Los plásmidos e insertos digeridos se purificaron y se ligaron para obtener los plásmidos recombinantes. Posteriormente se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* XL1-Blue con las mezclas de ligación mediante choque térmico. Se utilizó un control negativo de ligación en el que no había inserto que mostró que pocos plásmidos habían sido capaces de recircularizar como consecuencia de haber sido digeridos con una sola enzima. Posteriormente se analizó mediante PCR de colonias la presencia de los insertos. Los cebadores utilizados hibridaban en los plásmidos (**anexo I, tabla 9.4**), permitiendo diferenciar la presencia o no del inserto según el peso molecular del amplificado (**figura 5.3**). La mayoría de las colonias analizadas poseían el plásmido recombinante.

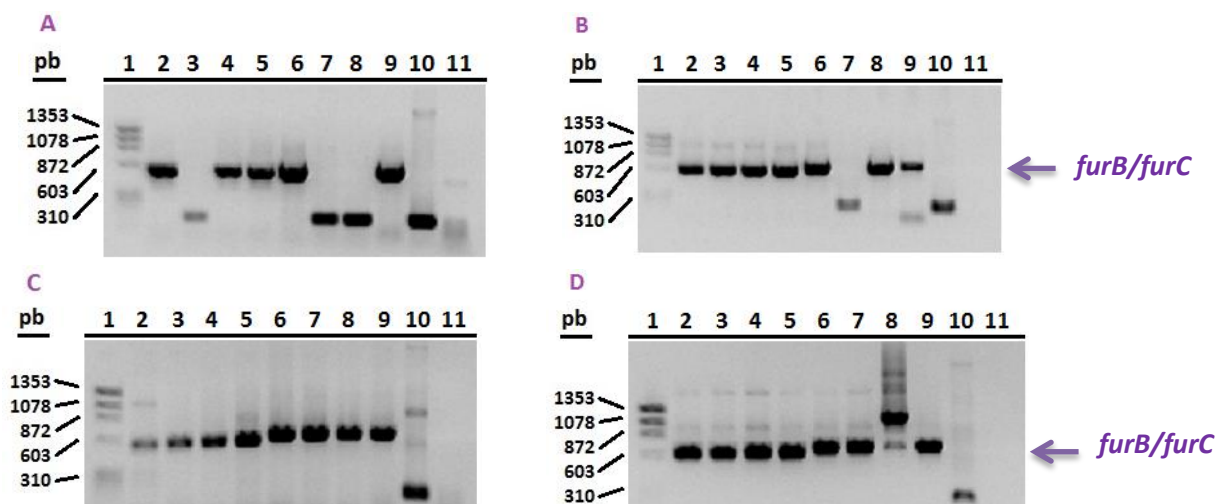


Figura 5.3. Comprobación del clonaje de *furB* y *furC* en los plásmidos del kit de doble híbrido. Amplificación de los genes *furB* y *furC* en los plásmidos pUT18C (A), pUT18 (B), pKNT25 (C) y pKT25 (D): carriles 1: marcador de peso molecular, carriles 2-5: *furB*, carriles 6-9: *furC*, carriles 10: controles de los plásmidos vacíos, carriles 11: controles negativos de PCR.

Se purificaron dos plásmidos de cada clonaje y se mandaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Zaragoza para comprobar que el vector contenía el inserto de cada gen sin mutaciones.

5.2 Cotransformación y experimento de doble híbrido

Finalmente, se purificaron los plásmidos del kit de doble híbrido conteniendo el gen *furA* a partir de células *E. coli* XL1-Blue. Se cotransformaron células quimiocompetentes *E. coli* BTH101 con 50 ng de dos plásmidos compatibles, uno de los cuales poseía el fragmento T25 y el otro, el fragmento T18 de adenilato ciclasa. Se utilizaron los plásmidos pUT18C y pKT25 como control negativo, y los plásmidos pUT18C-zip y pKT25-zip como control positivo. Se analizaron las interacciones tanto de las proteínas entre ellas como de las proteínas consigo mismas para formar homodímeros. Para cada pareja se analizaron todas las posibles combinaciones (8 por cada pareja de proteínas a estudiar), **anexo I, tabla 9.1**. De esta forma se asegura que ninguna de las interacciones entre los dos fragmentos de adenilato ciclasa, o entre las proteínas de fusión Fur, se vean afectadas por los impedimentos estéricos que supone la fusión de las proteínas [29].

Las células cotransformadas se sembraron en placas con los antibióticos de selección de ambos plásmidos, IPTG para inducir la expresión de las proteínas Fur y X-Gal como sustrato revelador de la interacción. Las placas se dejaron a 30°C, después se replicaron a una nueva placa para visualizar mejor las posibles interacciones. Se realizaron de 1 a 3 pases según fueran necesarios para la observación de los resultados.

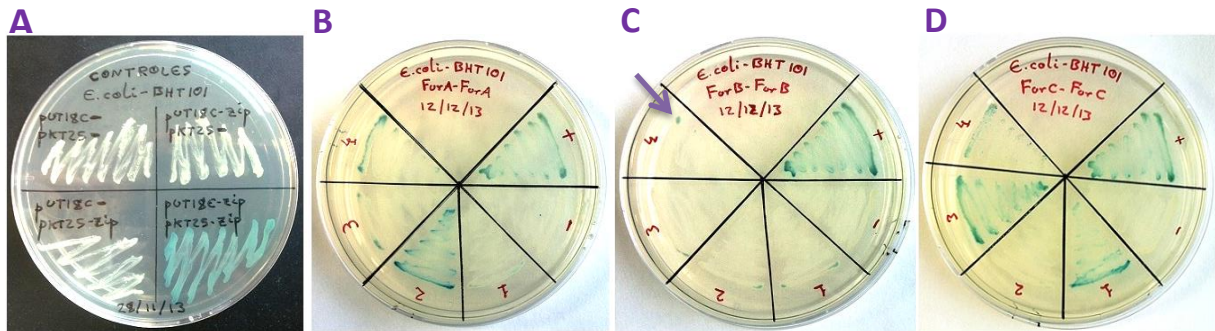


Figura 5.4. Resultados de la formación de homodímeros. Controles (A), FurA (B), FurB (C) y FurC (D). Secciones + : controles positivos, secciones - : controles negativos, secciones 1-4: combinaciones de plásmidos posibles para cada pareja.

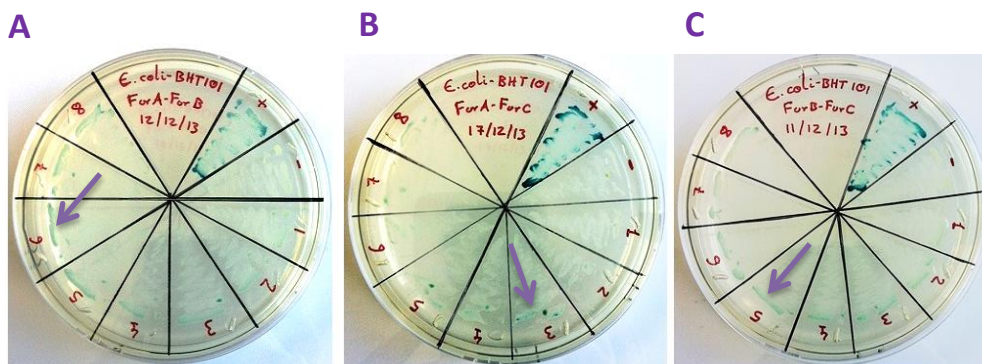


Figura 5.5. Resultados de la formación de heterodímeros. FurA-FurB (A), FurA-FurC (B), FurB-FurC (C). Secciones + : controles positivos, secciones - : controles negativos, secciones 1-8: combinaciones de plásmidos posibles para cada pareja.

Los resultados obtenidos muestran una clara señal en la formación de homodímeros de FurA (**figura 5.4**, imagen B, sección 2) y de FurB (**figura 5.4**, imagen D, secciones 1 y 3). Asimismo se aprecia señal más débil y no tan clara para la formación de homodímeros de FurB (**figura 5.4**, imagen C, secciones 1-4) y heterodímeros de FurA-FurB (**figura 5.5**, imagen A, secciones 4-8), FurA-FurC (**figura 5.5**, imagen B, secciones 3 y 5) y FurB-FurC (**figura 5.5**, imagen C, secciones 3-6).

5.3 Sobreexpresión y purificación de Fur de *E. amylovora*

Para purificar la proteína Fur de *E. amylovora* se sobreexpresó en *E. coli* BL21 (DE3) partiendo del plásmido recombinante pET28a con *fur*. La técnica utilizada para su purificación fue una cromatografía de afinidad a metales (IMAC).

5.3.1 Sobreexpresión y obtención de biomasa

Se transformaron mediante choque térmico células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) previamente preparadas con el plásmido recombinante pET28a con *fur*. Se analizó la sobreexpresión de la proteína en varias colonias de las células transformadas inducidas o no con IPTG 1 mM mediante una electroforesis SDS-PAGE al 15%. Los resultados (**figura 5.6**) indican que las colonias 2 y 3 muestran un nivel de sobreexpresión de Fur ligeramente mayor. Por tanto, se escogió la colonia 2 para cultivarla a gran escala y purificar la proteína.

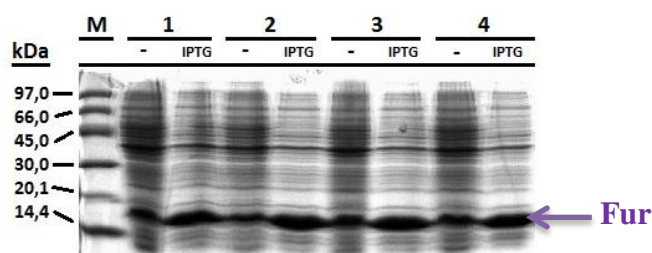


Figura 5.6. Sobreexpresión de Fur de *E. amylovora*. El carril M corresponde al marcador de peso molecular. Cada número se refiere una colonia distinta con sus cultivos inducidos o no (-) con IPTG.

Una vez escogida la colonia adecuada para realizar la sobreexpresión, se cultivó en 5l de medio, se llevó a fase exponencial y se indujo la sobreexpresión de Fur. El pellet bacteriano se lavó y se conservó congelado a -20°C. La cantidad de biomasa obtenida fue de 10 g.

5.3.2 Purificación de la proteína

El sistema elegido para purificar la proteína fue una cromatografía de afinidad a metales capaz de unir aquellas proteínas con varios residuos de His gracias a su interacción con los iones metálicos inmovilizados en la matriz. La proteína Fur de *E. amylovora* posee el motivo HHHDH, así que es de esperar que muestre suficiente afinidad por la matriz como para poder realizar su purificación con éxito sin necesidad de añadir una cola de His en su secuencia. El metal a inmovilizar se escogió siguiendo las instrucciones del fabricante. El cobre muestra mayor afinidad por las secuencias de histidina que el cobalto o el níquel, aunque proporciona una menor especificidad de purificación.

Se empaquetó la columna de cromatografía con la matriz, se inmovilizó en ella el cobre y se equilibró con el tampón de unión. Una vez preparada la columna, se preparó el extracto crudo partiendo de 5 g de biomasa que se descongelaron en tampón de unión con PMSF para inhibir las proteasas que pudieran degradar la proteína. Las células se rompieron por sonicación y se filtró el extracto crudo antes de cargarlo en la matriz. El extracto crudo preparado se cargó en la columna de purificación dejando una alícuota para analizar posteriormente la purificación de la proteína.

Se pasó el tampón de unión con 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a continuación se pasó el tampón de unión con glicina para eluir las proteínas unidas con baja afinidad al metal y finalmente se eluyó nuestra proteína con imidazol en tampón de unión. El imidazol, por ser el grupo lateral del residuo His compite fuertemente con los residuos de las proteínas unidas logrando eluir las. Se recogió el eluido en alícuotas de 1 ml que se guardaron a 4°C. Además, los lavados

realizados durante toda la purificación también se conservaron para poder recuperar la proteína en caso de que se hubiera eluido en alguno de ellos.

Finalizada la purificación se hizo un *screening* de las alícuotas de proteína obtenidas junto con los lavados y la alícuota conservada de extracto crudo, para confirmar que no se había perdido proteína en los lavados y averiguar en qué fracción de alícuotas estaba la más concentrada la proteína (**figura 5.7**).

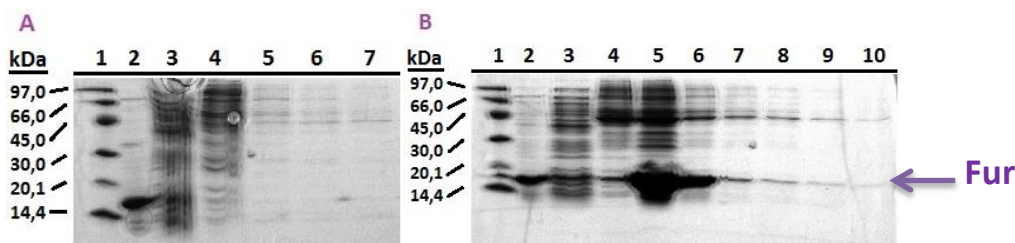


Figura 5.7. Perfil de purificación de Fur de *E. amylovora*. Fracciones del lavado de la columna (A): carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: extracto crudo y carriles 3-7: lavados consecutivos. Fracciones de la elución (B): carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: extracto crudo, carril 3: primer lavado, carril 4: alícuota 5, carril 5: alícuota 10, carril 6: alícuota 15, carril 7: alícuota 20, carril 8: alícuota 25, carril 9: alícuota 30 y carril 10: alícuota 35.

Los resultados indican que no se perdió nada de proteína en los lavados y que toda la proteína que se encontraba en el extracto crudo se obtuvo en las alícuotas recogidas. Además se observa que la máxima concentración de proteína se encuentra en torno a las alícuotas 10-15, por lo que se también se analizaron las alícuotas 7-9 y 16-18 (**Figura 5.8**).

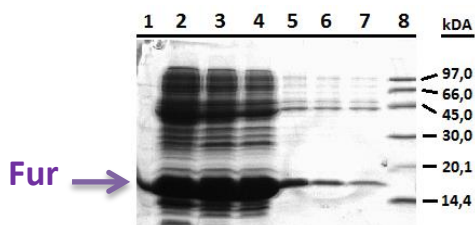


Figura 5.8. Perfil de alícuotas de purificación de Fur de *E. amylovora*. Carril 1: extracto crudo, carril 2: alícuota 7, carril 3: alícuota 8, carril 4: alícuota 9, carril 5: alícuota 16, carril 6: alícuota 17, carril 7: alícuota 18 y carril 8: marcador de peso molecular.

En el perfil de la elución (**figuras 5.7 y 5.8**) se aprecia que la proteína comienza a concentrarse en la alícuota 6 y termina en torno a la 20. Además, se observa que se ha obtenido un alto rendimiento en la purificación y que el grado de pureza, aunque no es muy elevado, es suficiente para realizar los ensayos de caracterización parcial de la proteína que se quieren llevar a cabo.

Se dializó la proteína para eliminar del medio el imidazol y las sales que pudieran hacerla precipitar. En función de los resultados anteriores, se agruparon todas las alícuotas en 3 tripas de diálisis según la concentración de Fur y la presencia de impurezas. En la primera tripa se juntaron las alícuotas de la 6 a la 14, que contenían la proteína muy concentrada y con bastantes impurezas, en la segunda las alícuotas de la 15 a la 25 que correspondían a la proteína menos concentrada pero más pura, y en la tercera las alícuotas de la 26 a la 41, que

contenían la proteína más diluida y con menos impurezas. El tampón utilizado para la diálisis contenía 50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM de NaCl y 10% de glicerol, y el sistema se mantuvo a 4°C. La disminución de sales del medio de la proteína durante la diálisis junto a la presencia del glicerol, tenían el fin de estabilizar la proteína en disolución y evitar su agregación. Aun así, cuando la proteína se introdujo en las tripas de diálisis se observaba que estaba comenzando a precipitar en la primera tripa, y finalizada la diálisis había precipitado una gran cantidad de proteína. Se centrifugó para evitar que la proteína sedimentada indujera la precipitación de proteína en el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió parte del pellet en H₂O y se vio que la proteína podía renaturalizarse por electroforesis SDS-PAGE.

5.3.3 Cuantificación de la proteína

Se cuantificó de forma aproximada la proteína en disolución en cada uno de los tres sobrenadantes tomando una alícuota de cada uno, midiendo su absorbancia a 280 nm y calculando su concentración mediante la ley de Beer-Lambert, utilizando como blanco el tampón usado en la última diálisis, y tomando el coeficiente de extinción teórico de ProtParam para la proteína oxidada.

La concentración de cada alícuota resultó ser de 391 µM en la fracción más concentrada, 33,2 µM en la fracción de concentración intermedia y 25,2 µM en la fracción con la proteína más diluida. Las tres fracciones se alicuotaron en tubos eppendorf y se conservaron a -20°C.

5.4 Caracterización parcial de Fur de *E. amylovora*

Se realizó una pequeña caracterización de la proteína con el fin de mostrar por un lado, que la proteína que permanecía en solución conservaba su conformación y actividad, y por otro lado con el objetivo de averiguar más a cerca de su estructura y función. El estudio de la proteína consistió en un análisis de oligomerización y entrecruzamiento, la detección de zinc estructural, y un ensayo de retardo en gel con los promotores de distintos genes que podrían estar regulados por Fur.

5.4.1 Estudio de oligomerización y entrecruzamiento

Como se ha visto en otros microorganismos, las proteínas Fur tienden a dimerizar [4]. Por ello se realizó un ensayo de oligomerización incubando diferentes muestras de proteína ya hervidas y desnaturalizadas en presencia o no de DTT 10 mM durante 10 min. El DTT es un agente reductor que actuará sobre las diferentes cisteínas rompiendo los puentes disulfuro y por tanto los posibles oligómeros formados a través de enlaces disulfuro. Los resultados se analizaron por una electroforesis SDS-PAGE al 15% (**figura 5.9**). El tampón de carga utilizado para todas las muestras no contenía β-mercaptoetanol ya que éste también actúa como agente reductor y nos podría reducir las proteínas del control negativo.

También se realizó un ensayo de entrecruzamiento. Esta técnica consiste en la formación de enlaces covalentes entre proteínas que se encuentran cercanas en solución a través de un agente entrecruzante. De esta forma es posible visualizar las interacciones de Fur con otras proteínas o entre monómeros de la misma. Para realizar este ensayo se incubó la proteína en

presencia y ausencia de glutaraldehído al 0,5%, como agente entrecruzante, durante 15 min y en oscuridad. El tampón de carga se añadió con β -mercaptoetanol. Los resultados se analizaron mediante una electroforesis SDS-PAGE al 15% (**figura 5.9**).

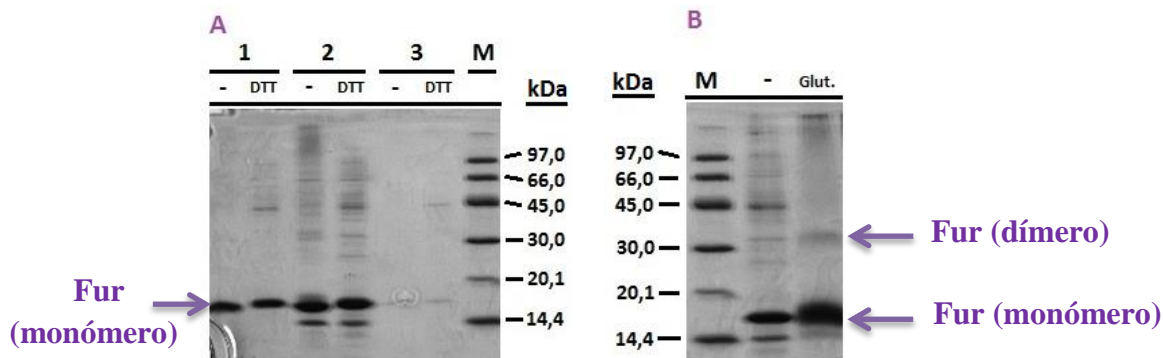


Figura 5.9. Resultados de los estudios de oligomerización. Efecto de la adición de agente reductor (A): se cargó la proteína a 30 μ M en presencia (DTT) o no (-) de DTT 10 mM y con tampón de carga sin β -mercaptoetanol. Estudio de entrecruzamiento (B): se cargó la proteína a 30 μ M en presencia (Glu) o no (-) de glutaraldehído al 0,5% y con tampón de carga con β -mercaptoetanol.

Las bandas de Fur muestran un peso menor en la forma oxidada que en la reducida. Como se ha visto en otras ocasiones con proteínas Fur [30], es posible que se deba a que la conformación de la proteína es más compacta en la forma oxidada y esto le permita migrar mejor en el gel. El ensayo de entrecruzamiento muestra una banda de peso mayor que 30 kDa que podría pertenecer a dímeros de Fur y una banda relativamente intensa casi al inicio del pocillo que podría corresponder a hexámeros de Fur.

5.4.2 Detección de zinc estructural

Como ya se ha dicho, muchas proteínas Fur contienen metal estructural además de unir el metal correpresor. Mediante el ensayo de detección de zinc estructural se quiso comprobar si Fur de *E. amylovora* une Zn^{2+} como se ha visto en otros microorganismos como *E. coli* [5]. Este ensayo se realizó tiñendo el gel con una solución de PAR capaz de revelar el zinc al reaccionar con H_2O_2 (**figura 5.10**).

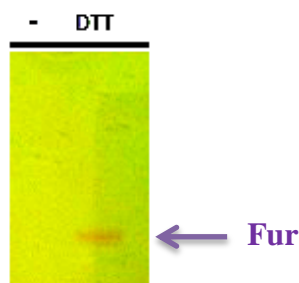


Figura 5.10. Detección de zinc mediante tinción con PAR. Se cargó la proteína a 30 μ M en presencia (DTT) o no (-) de DTT 10 mM y con tampón de carga sin β -mercaptoetanol.

La intensidad de la banda naranja observada (**figura 5.10**) indicó que es posible la presencia de zinc en la proteína en condiciones reductoras.

5.4.3 Análisis de la interacción con el DNA

Por su función reguladora, es de esperar que Fur de *E. amylovora* se una al promotor de distintos genes relacionados con el metabolismo del hierro. Para detectar la unión de la proteína al DNA se utilizó el ensayo de retardo en gel (EMSA), que consiste en la disminución de la movilidad electroforética del DNA cuando se forma el complejo proteína-DNA. Además, se añadió un DNA competidor al que la proteína no se une, para comprobar que no se producen interacciones inespecíficas entre el DNA y la proteína.

Este estudio se realizó con dos objetivos: por un lado, optimizar las condiciones de unión al DNA de Fur de *E. amylovora*, y por otro lado, averiguar si la proteína interviene en la regulación de distintos genes. Los promotores de los genes seleccionados para realizar el ensayo fueron los siguientes: *fur*, porque se ha visto que en muchos casos Fur es capaz de autorregularse, *hrpL*, por regular un cluster de virulencia y *hrpS*, por actuar como coactivador del factor σ^{54} implicado en respuestas a estrés [31]. La región promotora (los 400 pbs anteriores al codón ATG de cada gen aproximadamente) se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de *E. amylovora* CFBP 1430.

Los ensayos de unión a DNA se realizaron bajo diferentes condiciones que pudieran afectar a la conformación y actividad de la proteína, se probaron concentraciones de proteína entre 300 y 1000 nM en presencia o ausencia de 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM Mn^{2+} y 1 mM Zn^{2+} . El Mn^{2+} actuaría sustituyendo al hierro, que es más inestable. Las mezclas de reacción se incubaron durante unos 15 min a temperatura ambiente para dar lugar a la unión de la proteína al DNA antes de añadirles el tampón de carga y cargarlas en el gel (**figura 5.11**).

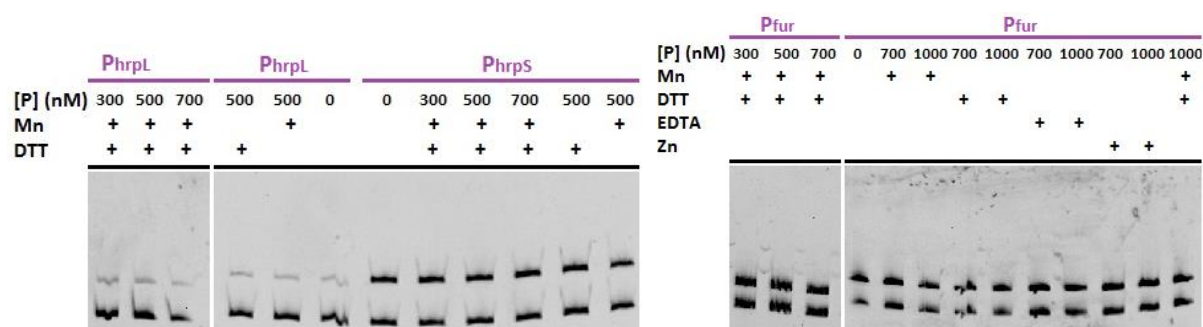


Figura 5.11. Ensayos EMSA. En cada carril se cargó distinta concentración de proteína en presencia de 40 ng de DNA específico y 40 ng de DNA competidor, BSA 0,01 μ g/ml, y 1 mM de Mn^{2+} , DTT, EDTA y/o Zn^{2+} según se indica en la muestra.

Como se observa en las imágenes de la figura 5.11., no se obtuvo ningún resultado positivo de unión de Fur a los promotores. Seguramente se debe a que no se han logrado las condiciones para que Fur sea activa, ya que era de esperar que al menos se uniese a su propio promotor porque la mayoría de proteínas Fur identificadas son capaces de autorregularse por este mecanismo [24].

6. Discusión

6.1 Interacciones de FurA, FurB y FurC en *Anabaena*

Ha sido demostrado mediante estudios *in vitro* que FurA, FurB y FurC son capaces de regular su actividad a distintos niveles, mediante la unión a sus promotores, y mediante la formación o no de oligómeros [24].

Tanto la proteína FurA, como la FurB son capaces de unirse a los promotores *furA*, *furB* y *FurC* y reprimir su transcripción. Por otro lado, la proteína FurC no es capaz de unirse a ningún promotor de estos tres genes pero se ha visto que en ensayos de retardo en gel llevados a cabo con las 3 proteínas combinadas, FurC potenciaba la unión de FurA por el DNA y disminuía la de FurB. Estos resultados llevan a plantear la hipótesis de que FurC podría regular a FurA y FurB mediante la formación de heterodímeros con ella [24].

En este contexto se ha realizado el experimento doble híbrido para comprobar las interacciones cruzadas entre las 3 proteínas *in vivo* y averiguar más sobre su posible combinación o regulación. Los resultados obtenidos apoyan fuertemente la formación de homodímeros tanto de FurA como de FurC. Sin embargo la formación de homodímeros por parte de FurB no se ve tan clara. Esto puede deberse a que los niveles intracelulares de Zn^{2+} podrían mantener a FurB en su forma inactiva y por tanto monomérica [21, 24], ya que se ha visto que FurB se une al DNA en forma de dímero. Por otro parte, los datos previos de la literatura indican que la forma activa de las proteínas Fur es un dímero [4], lo que explicaría la intensa formación de homodímeros observada en los casos FurA y FurC. Además la formación de homodímeros de FurC apoyaría su papel como regulador génico que podría actuar sobre los promotores de otros genes diana con otras características desconocidas.

Los resultados obtenidos acerca de las interacciones entre FurA y FurB, FurA y FurC, y FurB y FurC indican que es posible que las proteínas formen heterodímeros, sin embargo los resultados no son totalmente concluyentes ya que el ensayo de doble híbrido puede presentar tanto falsos positivos como falsos negativos.

Las interacciones de FurC con FurA y FurB encajarían con la hipótesis que indica su papel regulador a través de la formación de heterodímeros. Se ha visto que FurC y FurB se expresan menos que FurA en condiciones basales, pero en condiciones oxidativas incrementa la expresión de FurC y FurB aunque no la de FurA, a pesar de que ésta también actúa en la defensa contra el estrés oxidativo [1, 24]. Es posible que FurC se exprese más en condiciones de estrés oxidativo y potencie la actividad de FurA a través de la formación de los heterodímeros. Sin embargo es menos comprensible la interacción con FurB. Se ha visto que FurC disminuye la actividad de FurB, en cuyo caso se explicaría la formación de heterodímeros. Pero ambas proteínas actúan protegiendo la célula del estrés oxidativo por lo que aparentemente no tiene sentido que FurC inhiba a FurB. Esta interacción podría explicarse si se considera el papel dual de FurB. En condiciones normales FurB se expresaría

poco, actuaría como regulador génico y FurC modularía su actividad mediante la formación de dímeros. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo FurB se sobreexpresaría para proteger la célula del daño oxidativo y superaría la inhibición de FurC.

La interacción entre FurA y FurB podría darse al tener ambas un dominio C-terminal relativamente homólogo que las llevaría a poder formar heterodímeros capaces de unirse al DNA. Aunque se ha realizado un blast tomando los últimos 60 aminoácidos de cada proteína y se ha obtenido una identidad de sólo el 22%. Otra explicación sería que FurA y FurB participarían en un mismo proceso como heterodímero. Es posible que este mecanismo se diera en la defensa frente estrés oxidativo, ya que ambas proteínas participan en proteger a la célula en esta situación.

En cualquier caso el color de las colonias obtenido en las interacciones cruzadas entre FurA, FurB y FurC es muy débil con respecto al control positivo y como ya se ha dicho la técnica del doble híbrido presenta varias limitaciones. En algunos casos la sobreexpresión de las proteínas de fusión puede dar concentraciones tan altas que hagan interaccionar a las proteínas de forma no natural. También puede ocurrir que aunque las proteínas sean capaces de interaccionar, su expresión se dé al mismo tiempo en la célula, aunque este no es el caso de las proteínas Fur de *Anabaena*. Además puede ocurrir que las células degraden el X-Gal con otras enzimas. Por lo tanto son necesarios estudios alternativos que aporten más información sobre las interacciones de las tres proteínas.

6.2 Purificación de Fur de *E. amylovora*

Hasta ahora no se había realizado ningún estudio sobre Fur de *E. amylovora*. En este trabajo se ha establecido un protocolo de purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) usando Cu^{2+} como metal de afinidad y un gradiente de imidazol de 0 a 1M para su elución. El resultado ha sido que la proteína se ha obtenido con un alto rendimiento y un grado de pureza del 90%. No obstante, tras purificar la proteína y dializarla para eliminar de ella las sales y el imidazol, se pierde una gran cantidad de proteína por precipitación, por lo que sería necesario incrementar su estabilidad tras la purificación añadiendo agentes estabilizantes. Otra forma de mejorar el protocolo de purificación sería utilizar un gradiente menor de imidazol ya que la proteína se eluyó en las primeras alícuotas del gradiente. Finalmente, se ha probado a resuspender proteína precipitada en solución y ha sido capaz de renaturalizarse, por lo que esta podría ser una forma de recuperar parte de la proteína perdida por precipitación.

En los ensayos de caracterización parcial se ha visto que Fur de *E. amylovora* une zinc posiblemente como metal estructural, tal y como se ha visto en Fur de otras enterobacterias como *E. coli* [5]. Además lo hace cuando sus residuos de cisteína se encuentran reducidos. En los ensayos de entrecruzamiento y oligomerización se ha obtenido principalmente como monómero, aunque se ha obtenido una fracción minoritaria como dímero y otra que podría corresponder a la formación de hexámeros. Además, se ha visto que en condiciones oxidantes la proteína migra de forma diferente durante la electroforesis SDS-PAGE lo que seguramente

se debe a una conformación más compacta de la misma debido a los puentes disulfuro intracatenarios.

Por último se han tratado de buscar las condiciones óptimas de interacción de Fur por el DNA mediante ensayos de retardo en gel utilizando tres promotores: *hrpL*, *hrpS* y el suyo propio. Se han utilizado condiciones de ensayo similares a las descritas para Fur de *E. chrysanthemi* añadiendo Mn^{2+} a las muestras [27]. Además se ha probado con otras condiciones que han funcionado en los ensayos de otras proteínas Fur: presencia de Zn^{2+} , EDTA, DTT y un amplio rango de concentración de proteína. En ningún caso la proteína se ha unido al DNA. Se ha buscado la caja fur GATAAT *in silico* en la región de promotora de *fur* pero no se ha encontrado. Tal vez no esté autorregulada, no obstante es muy posible que posea otra secuencia rica en A/T como caja *fur* y que no se hayan encontrado todavía las condiciones óptimas para la unión, ya que se ha visto que Fur es capaz de unirse a su propio promotor y autorregularse en la gran mayoría de los casos [1]. Por lo tanto es necesario realizar más ensayos hasta dar con las condiciones óptimas de unión de Fur al DNA, o considerar que la proteína obtenida se ha inactivado, o que su forma recombinante es inactiva.

7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1-Como se ha visto en el ensayo de doble híbrido, las proteínas FurA, FurB y FurC son capaces de formar homodímeros *in vivo* en células de *E. coli* BTH101, aunque los dímeros de FurB muestran una interacción más débil que los de FurA y FurC.

2-Expresadas también en células de *E. coli* BTH101 recombinantes, las proteínas FurA, FurB y FurC muestran indicios de formar heterodímeros *in vivo*, pero habría que realizar otras técnicas alternativas para confirmarlo.

3-Es posible sobreexpresar y purificar Fur de *E. amylovora* en células de *E. coli* BL21 (DE3) mediante una cromatografía de afinidad a Cu^{2+} .

4-La proteína Fur de *E. amylovora* contiene zinc estructural cuando sus cisteínas están reducidas.

5-En los ensayos realizados de retardo en gel, la proteína Fur de *E. amylovora* no es capaz de unirse a los promotores de los genes *fur*, *hrpL* y *hrpS* en las condiciones probadas (presencia o ausencia de DTT, manganeso, zinc y EDTA). No se puede descartar que la proteína purificada se haya inactivado.

Conclusions

The results obtained in this work, allow us to conclude:

1- Double hybrid assay indicates that FurA, FurB and FurC are able of forming homodimers *in vivo* in *E. coli* BTH101 cells, with a weaker interaction in the case of FurB as compared to FurA and FurC.

2-Also using *E. coli* BTH10 for double hybrid assay, the results suggests that FurA, FurB and FurC may form heterodimers *in vivo*. Other experimental approach should be used for confirmation.

3-It is possible to overexpress and to purify *E. amylovora* Fur proteins in *E. coli* BL21 (DE3) cells by way of a Cu^{2+} affinity chromatography.

4-The *E. amylovora* Fur protein contains zinc when its cystines are reduced.

5- In the gel retardation tests the Fur protein of *E. amylovora* is not able of binding the promoters of the *fur*, *hrpL* and *hrpS* genes in the conditions that were tested for (presence or absence of DTT, zinc, manganese and EDTA). It is also possible that the recombinant protein was obtained in an inactive form.

8. Bibliografía

1. M. F. Fillat, (2014) The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Mar 15;546:41-52.
2. A. Palacio-Bielsa, (2012) El fuego bacteriano de las rosáceas. (*Erwinia amylovora*).
3. J. E. Posey, F. C. Gherardini, Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, 2 June 2000, 288(5471):1651-1653.
4. A. Bagg, J. B. Neilands, (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1987 Aug 25;26 (17):5471-7.
5. B. D'Autréaux et al. Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry*. 2007 Feb 6;46(5):1329-42.
6. C. Dian, (2008) The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites. *Mol Microbiol*. 2011 Mar;79(5):1260-75.
7. J. L. Lavrrar, M. A. McIntosh, Architecture of a Fur Binding Site: a Comparative Analysis. *J Bacteriol*. Apr 2003; 185(7): 2194–2202.
8. B. M. Carpenter et al. Identification and Characterization of Novel *Helicobacter pylori* apo-Fur-Regulated Target Genes. *J Bacteriol*. Dec 2013; 195(24): 5526–5539.
9. J. Igarashi et al. Emerging roles of heme as a signal and a gas-sensing site: heme sensing and gas-sensing proteins. In *Handbook of Porphyrin Science*, vol. 15, 2011, pp. 399–461.
10. S. Pellicer et al. Site-directed mutagenesis and spectral studies suggest a putative role of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 as a heme sensor protein. *FEBS J*. 279 (2012) 2231–2246.
11. L. Botello-Morte et al. Unraveling the redox properties of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120: disulfide reductase activity based on its CXXC motifs. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 20;20(9):1396-406.
12. J. P. McHugh et al. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):29478-86.
13. P. Alamuri, Regulation of the *Helicobacter pylori* Fe-S Cluster Synthesis Protein NifS by Iron, Oxidative Stress Conditions, and Fur. *J Bacteriol*. Jul 2006; 188(14): 5325–5330.
14. A. Nandal, Induction of the ferritin gene (ftnA) of *Escherichia coli* by Fe(2+)-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Mol Microbiol*. 2010 Feb;75(3):637-57.
15. K. Hantke, Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2001 Apr;4(2):172-7.
16. M. Zheng, OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol*. 1999 Aug;181(15):4639-43.
17. J. A. Hernández et al. Mutants of *Anabaena* sp. PCC 7120 lacking alr1690 and alpha-furA antisense RNA show a pleiotropic phenotype and altered photosynthetic machinery. 2010, 167(6):430-437

18. Y. Oriosa, (2006) Incorporation of different N sources and light response curves of nitrogenase and photosynthesis by cyanobacterial blooms from rice fields. *Microb Ecol* 51: 394-403.
19. S. Lopez-Gomollon et al. Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in *anabaena* (*Nostoc*) sp. *J Mol Biol*, 2007. 374(1): p. 267-81.
20. A. Gonzalez, et al. Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology. *Plant Cell Physiol.* **51**(11): p. 1900-14.
21. S. Lopez-Gomollon et al. New insights into the role of Fur proteins: FurB (Al12473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem J*, 2009. 418(1): p. 201-7.
22. E. Broset, (2012) Rol de FurC en *Anabaena* sp. PCC 7120. Departamento de bioquímica y biología molecular de la Universidad de Zaragoza.
23. F. Yingping, (2014) Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (alr0957) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120.
24. J. A. Hernández et al. (2004) Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC 7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiology Letters* 236 (2004) 275–282.
25. S. V. Beer, (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters* 253:185-192.
26. T. H. M. Smits, B. Duffy, Genomics of iron acquisition in the plant pathogen *Erwinia amylovora*: insights in the biosynthetic pathway of the siderophore desferrioxamine E. *Arch Microbiol* (2011) 193:693–699.
27. T. Franza et al. (2002) Coupling of iron assimilation and pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *MPMI* Vol. 15, No. 11, 2002, pp. 1181–1191.
28. G. Karimova, A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5752-6.
29. A. Battesti, The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods*. 2012 Dec;58(4):325-34.
30. D. Ortiz, DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol Gen Genet.* 2000 Oct;264(3):341-53.
31. Z. M. Wei, S. V. Beer, (1995) *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol.* 1995 Nov;177(21):6201-10.

9. Anexo I

Tabla 9.1 Cepas y plásmidos utilizados

| <u>Cepas y plásmidos</u> | <u>Características y uso</u> | <u>Casa comercial</u> |
|--------------------------------|--|--|
| Cepas de <i>E. coli</i> | | |
| XL1-Blue | RecA1, EndA1, GyrA96, Thi-1, HsdR17, SupE44, RelA1, Lac [F' ProAB LacIq ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)], para los clonajes de los plásmidos con <i>furA</i> , <i>furB</i> y <i>furC</i> de <i>Anabaena</i> . | Stratagene |
| BTH101 | F ⁻ , Cya-99, AraD139, GalE15, GalK16, RpsL1 (Str ^r), HsdR2, McrA1, McrB1, como cepa reportera del experimento doble híbrido. | Euromedex, Two-Hybrid (BACTH) System Kit |
| BL21(DE3) | OmpT HsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) Gal Dcm (DE3), para la sobreexpresión y purificación de Fur de <i>E. amylovora</i> . | EMD Biosciences |
| Plásmidos | | |
| pKT25 | Vector con sitio de clonaje múltiple en el extremo 3' del fragmento T25 de adenilato ciclasa, de bajo número de copias y Km ^R . | Euromedex, Two-Hybrid (BACTH) System Kit |
| pKNT25 | Vector con sitio de clonaje múltiple en el extremo 5' del fragmento T25 de adenilato ciclasa, de bajo número de copias y Km ^R . | Euromedex, Two-Hybrid (BACTH) System Kit |
| pUT18C | Vector con sitio de clonaje múltiple en el extremo 3' del fragmento T18 de adenilato ciclasa, de alto número de copias y Amp ^R . | Euromedex, Two-Hybrid (BACTH) System Kit |
| pUT18 | Vector con sitio de clonaje múltiple en el extremo 5' del fragmento T18 de adenilato ciclasa, de alto número de copias y Amp ^R . | Euromedex, Two-Hybrid (BACTH) System Kit |
| pKT25-zip pUT18C-zip | Vectores derivados del pKT25 y pUT18C que contienen la cremallera de leucina GCN4 como proteína de fusión a T25 y T18, respectivamente. Sirven como control positivo del experimento doble híbrido ya que al ser cotransformados las cremalleras de leucina dimerizan y se restablece la proteína adenilato ciclasa. | Euromedex, Two-Hybrid (BACTH) System Kit |
| pET28-a | Vector de expresión, Km ^R . | EMD Biosciences |

Tabla 9.2 Cebadores utilizados para el clonaje de *furB* y *furC*

| Cebador | Secuencia | Enzima |
|---------------------|--|---------------|
| FurC forward | 5'-CGCGGATCCCATGCAGCAACAGGCAATATCGAC-3' | <i>Bam</i> HI |
| FurC reverse | 5'-CGGGGTACCCGCTCTTCATCTTGAGGATGCCG-3' | <i>Kpn</i> I |
| FurB forward | 5'-CGCGGATCCCATGAGAGCCATACGCACCCGCAG-3' | <i>Bam</i> HI |
| FurB reverse | 5'-CGGGGTACCCGAATTTCACTCGCGTGATTTCATTTGGC-3' | <i>Kpn</i> I |

Tabla 9.3 Cebadores utilizados en secuenciación y detección de inserto

| Cebador | Secuencia | Plásmido |
|----------------|--------------------------|---------------|
| Batch 1 | GTGTGGAATTGTGAGCGGAT | pKNT25, pUT18 |
| Batch 2 | GCCAGACTCCCGGTCGGCG | pKNT25 |
| Batch 3 | GTTGCGCCATTATGCCGCATC | pKT25 |
| Batch 4 | GGATGTGCTGCAAGGCGATT | pKT25 |
| Batch 5 | TTCCACAACAAGTCGATGCG | pUT18 |
| Batch 6 | CGTCGCTGGGCGCAGTGGAACGCC | pUT18C |
| Batch 7 | CTTAACATATGCGGCATCAGAGC | pUT18C |

Tabla 9.4 Cebadores utilizados en la amplificación de promotores para EMSA

| Cebador | Secuencia |
|-------------------|----------------------------|
| Pfur - Fw | GGCCTGAACTGAGCAACCTGGCG |
| Pfur - Rv | GCGGATTTTGTCTGTTACTTTGC |
| PhrpL - Fw | GCGCGCCGACGCACTGGCTGCTGC |
| PhrpL - Rv | GGCTTGCTCCGTTACTAAATCAGG |
| PhrpS - Fw | GCGGACATCGTGAAATACGCCATTAG |
| PhrpS - Rv | CATAAAAAATTACCCCTGCCCTATCC |

Tabla 9.5 Composición para dos geles SDS-PAGE al 15%

| Reactivo | Gel separador 15% | Gel concentrador 5% |
|---|-------------------|---------------------|
| acrilamida : bisacrilamida (30:0,8 p/v) | 4,5 ml | 0,66 ml |
| Tris/HCl 1,5 M pH 8,8 | 3,36 ml | - |
| Tris/HCl 0,5 M pH 6,8 | - | 0,5 ml |
| H ₂ O | 1,06 ml | 2,80 ml |
| SDS al 10% | 45 µl | 20 µl |
| APS al 10% | 30 µl | 20 µl |
| TEMED | 15 µl | 20 µl |

Tabla 9.6 Composición para dos geles EMSA al 6%

| Reactivo | Volumen añadido |
|--|-----------------|
| acrilamida : bisacrilamida (30:0.8, p/v) | 4,12 ml |
| Tampón de electroforesis 5X | 3,72 ml |
| Glicerol al 50% | 2,80 ml |
| H ₂ O | 9,72 ml |
| APS (0.24 g/l) | 100 µl |
| TEMED | 40 µl |